キラル化合物の多次元分離の改善を目的とした LTM オーブンモジュールによるカラムの個別温度制御

アプリケーション

食品および香料

著者

Frank David
Research Institute for
Chromatography Pres. Kennedypark
26, B-8500 Kortrijk Belgium

Matthew S. Klee
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808

概要

Deans スイッチハートカット機能とカラムの個別温度制御機能を備えた多次元キャピラリ GC システムによるリナロール鏡像異性体のキラル分離能の改善について説明します。最初に、香料サンプルやラベンダー油サンプルに含まれるリナロールを、通常の GC オーブンに取り付けた非キラル無極性カラム (Agilent J&W HP-5ms) で分離します。リナロールのピーク付近を切り取り、低熱容量 (LTM) 素材で編みこまれたキラルシクロデキストリンカラムへ移します。このカラムは、鏡像異性体の分離能を高めるために低温に設定されています。カラムの個別温度制御機能を備えた二次元 LTM カラムのシステム構成により、キラル分離能が向上し、シクロデキストリン固定相のブリードが減り、分析時間が短くなります。さらに、カラムを汚染してメソッドのパフォーマンスを低下させ、カラムの寿命を短くする恐れのある低揮発性サンプル成分からキラルカラムを保護できます。

Agilent Technologies

はじめに

リナロールは、ラベンダー油、ゼラニウム油、ベルガモット油など、数多くの精油における重要な芳香成分です。花のような心地よい香りがします。天然油や香料に含まれるリナロールの特性を正しく解析するためには、鏡像異性体の組成 (含有比率) を知る必要があります。特に、粗悪品や模造品を暴こうとするときにはこの作業が不可欠です。リナロールの (+) および (–) 鏡像異性体のキラル分離は、誘導体化法を使用しなくてもシクロデキストリンベースのキャピラリ GC カラムによって行うことができます [1]。

シクロデキストリンベースカラムでの鏡像異性体の GC 分離はカラム温度に大きく左右されます。温度が低くなるほど、分離性能が高まります。もちろん温度と性能のバランスを取らなければなりません。分析時間が過剰に長くならないようにすると同時に、低温ではカラムに残留してしまいそうな溶出の遅いサンプル成分をしっかり溶出させ、その後の分析に影響を及ぼすカラム残留物を発生させないようにする必要があります。シクロデキストリンベースカラムは、最高許容使用温度 (MAOT) が低く、高レベルのブリードを伴い、標準的な無極性キャピラリカラム相に比べて脆弱な (酸化分解を起こしやすい) カラムです。したがって、保持力の高いサンプル成分を焼き出すために長時間にわたって高温加熱することは避けるべきです。残念なことに、大部分のシリコンベース固定相とは異なり、いったん汚染されたシクロデキストリン相は溶媒洗浄で再生することもできません。

こうした理由から、多次元 GC システムの使用が望まれます。これは、低揮発性成分を排除してカラムが高いオーブン温度にさらされる時間を短くするためです [2、3]。その場合、非選択的なカラムによる前処理分画を行って他のサンプル成分から目的のピークを分けておきます。対象ピークの前後を切り取って 2 番目のキラルカラムへ移せば、鏡像異性体をきれいに分離できます。最適な結果を得るために 2 つのカラムの温度は個別に制御します。このため、2 台の GC を並べて設置するというのも 1 つの方法です。この方法は、効果的ではありますが、往々にしてコストやスペースの要件が非常に高くなります。この他に、GC オーブンドアと一体化した低熱容量 (LTM) モジュールを使用するという選択肢もあります。この方法では、システムの占有面積を最小限に抑え、導入コストを引き下げながらも、完全に独立したカラム温度ゾーンを確保できます [4]。

本アプリケーションノートでは、Deans スイッチハートカット機能とLTMカラムモジュールによるカラムの個別温度制御機能を備えた二次元キャピラリガスクロマトグラフィ (CGC) システムを使用して、香料やラベンダー油サンプルに含まれるリナロールの鏡像異性体を分離する方法について説明します。

実験手法

サンプル

用意したサンプルは、(合成) リナロール 0.1 % のジクロロメタン溶液 (較正用の標準サンプル)、市販の香水を 5 % に希釈したジクロロメタン溶液 (50 mg を1 mL に希釈)、天然ラベンダー油を 2 % に希釈したジクロロメタン溶液 (20 mgを 1 mL に希釈) の 3 種類です。

構成

分析を行った装置は、Agilent 7890A GC システム/Agilent 5975C シリーズ GC/MSD の組み合わせです。GC には、スプリット/スプリットレス注入口、炎イオン化検出器 (FID)、圧力/流量制御モジュール、キャピラリ・フロー・テクノロジー Deans スイッチシステム (p/n G2855B)、Agilent LTM システムコントローラバンドル (p/n G6579A)、および Agilent J&W LTM カラムモジュール (最速冷却用の標準型 5 インチサイズ) が装備されています。

1 番目のカラムは、GC オーブン (スプリット/スプリットレス注入口と Deans スイッチとの接続部分) に取り付けた 30 m × 内径 0.25 mm × 0.25 µmの Agilent J&W HP-5MS です。30 m × 内径 0.25 mm × 0.25 µm の Agilent J&W CycloDex-B (p/n 112-2532) キラルカラムに LTM の直接加熱ヒータと温度センサーを一緒に織り込み、LTM カラムモジュール(p/n 112-2532 LTM カラム) に取り付けました。0.5 m × 内径 250 µm の不活性フューズドシリカチューブで LTM カラムと Deans スイッチをつなげ、1 m × 内径 250 µmの不活性フューズドシリカチューブをトランスファーラインとして使用して LTM カラムと質量選択検出器 (MSD) をつなげます。63 cm × 100 µm の不活性フューズドシリカキャピラリで Deans スイッチをモニタリング FID につなげます。

構成図を図 1 に示します。

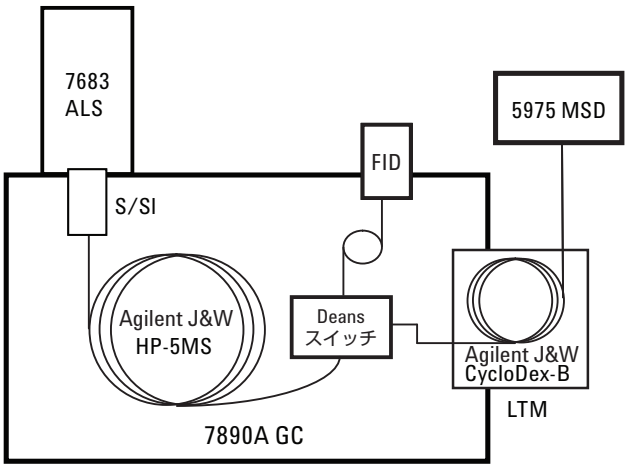

図 1. カラムの個別温度制御による二次元ハートカットを行うためのシステム構成。

分析条件

注入:	1 µL、280 °C、スプリット比 1:100
キャリア:	ヘリウム、1 mL/min のコンスタントフローモード (カラム入口 = SSL、出口 = PCM1) (70 °Cで179 kPa)
GC オーブン温度:	70° C (1 分)、10 °C/min で 250°C (11 分) まで
PCM 1:	2 mL/min のコンスタントフローモード (70 °Cで 128 kPa)
LTM オーブン:	80 °C (9 分 = ハートカットの終わり) から 1 °C/min の温度プログラムで 100 °C (1 分) まで加熱
合計分析時間:	30 分
モニター用FID検出器:	300 °C、H2 = 30 mL/min 、空気 = 400 mL/min
Deans スイッチバルブ:	初期状態はオフ、8.5 分でオン、8.9 分でオフ (8.5 分～8.9 分までの 0.4 分間で 2 番目のカラムへのハートカットが行われる)
MS:	スキャンモード、40 ～ 300 Amu、サンプリングスピード = 21

結果と考察

シクロデキストリンカラムにおけるリナロール鏡像異性体の分離能に対する温度の影響は、(2 つの鏡像異性体の含有比率が 50:50 の) 合成リナロールを含んだ標準サンプルの分析によって明らかにすることができます。温度プログラム (70 °C (1 分) から 10 °C/min の昇温レートで 200 °Cまで加熱するというプログラム) を使用してシクロデキストリンカラムで得たクロマトグラムを図 2 に示します。このクロマトグラムから、165 °Cの溶出温度では鏡像異性体が分離されていないことが分かります。190 °Cを超えるとブリードが顕著になっていることも分かります。

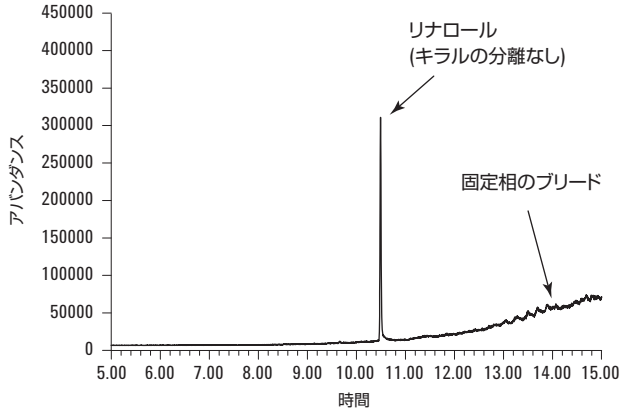

図 2. ピーク付近を切り取って LTM モジュールに移したリナロール標準サンプル。2 番目のシクロデキストリンカラムは、70 °C (1 分) から10 °C/min の昇温レートで 250 °C (11 分) まで加熱されるようにプログラミングされています。10.5 分の時点、165 °C の溶出温度ではリナロールの鏡像異性体は分離されていません。

これよりも緩やかな温度プログラム (80 °Cで 9 分間、1 °C/min の昇温レートで 100 °Cまで加熱するプログラム) を使用すると、図 3 に示すように鏡像異性体が分離できました (23 分の時点 = 94 °Cの温度で溶出)。

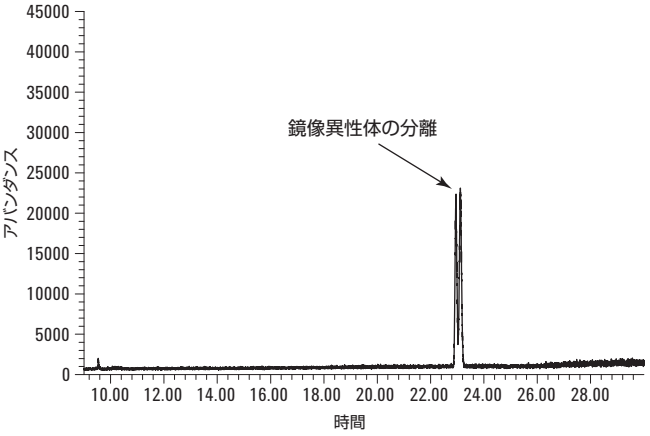

図3. ピーク付近を切り取って LTM モジュール (2 番目のシクロデキストリンカラム) に移したリナロール標準サンプル (80 °Cで 9 分間、1 °C /min の昇温レートで 100 °Cまで加熱する緩やかな温度プログラムを使用した場合)。94 °Cの溶出温度でリナロールの鏡像異性体が分離されています。

図4 のクロマトグラムから、こうした条件が残念ながら実際のサンプル分析には適していない理由が分かります。これは、元の温度プログラムを使用してキラルカラムで香料サンプルを直接分析したときのクロマトグラムです。サンプルを完全に溶出するには、200 °Cという最終温度を 16 分間維持しなければなりませんでした。非常に高いブリードが現れているところから、カラムに熱ストレスが掛かっていることが分かります。また、他の数多くのサンプル成分がリナロールの近くで溶出していることも明らかで、この結果、未分離の鏡像異性体さえ定量することが難しくなる可能性があります。緩やかな温度プログラムを使用すれば、分析時間が極端に長くなり、カラムから完全には溶出されないサンプル成分が残る可能性が増えることになります。

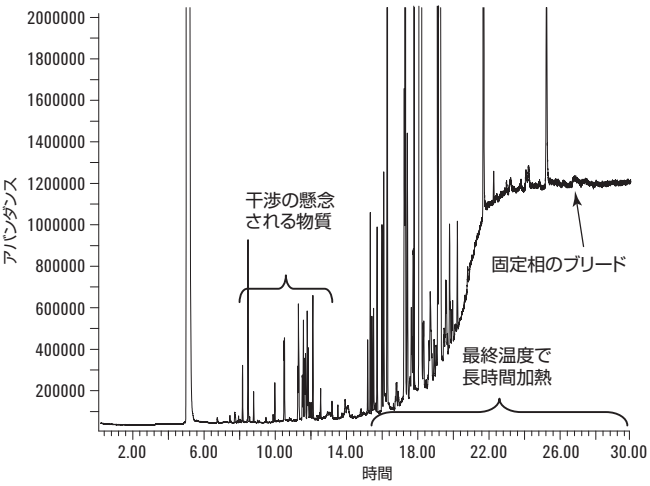

図 4. キラルカラムのみで 70 °C (1 分)、10 °C/min の昇温レートで 200 °C (16 分) まで加熱した香料サンプルの一次元分離。リナロールの鏡像異性体は分離されず、干渉が懸念される成分が相当な数に昇り、固定相のブリードが高くなります。

キラルカラムの汚染やカラムにかかるストレスを未然に防ぎながらリナロールの鏡像異性体を効果的に分析するために二次元 GC 分離法を開発しました。最初に、サンプルを選択性の低い無極性カラム (Agilent J&W HP-5MS) で分離しておきます。このカラムは、揮発性に基づいてサンプル成分の分離を行うものであり、キラルカラムよりもはるかに堅牢でブリードの少ないカラムです。残念ながら、この相でキラル分離は行えません。図 5. (a)は、ハートカットを行っていない 1 番目のカラムからのFID クロマトグラムです。リナロールは 8.7 分に溶出しています。

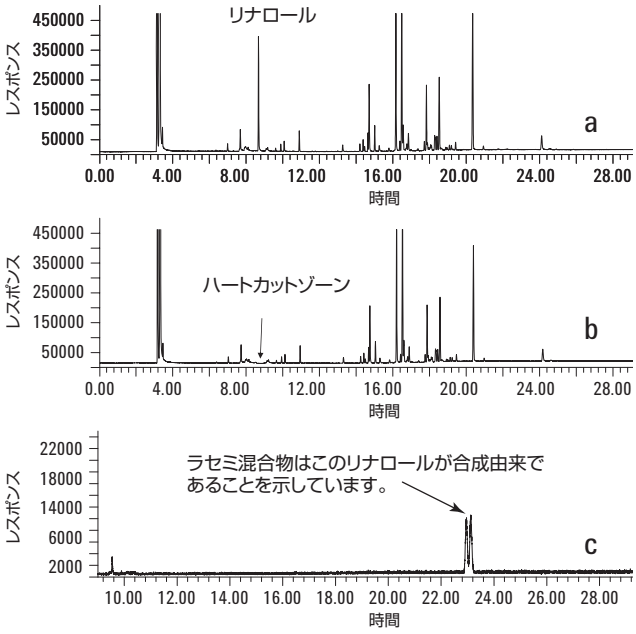

図 5. (a) ハートカットなしで 1 番目のカラム (Agilent J&W HP-5MS) で分離した香料サンプル。(b) 8.5 ～ 8.9 分のハートカットを 2 番目のカラムに移して分離した香料サンプルのクロマトグラム。(c) 2 番目のシクロデキストリンカラムで分離したリナロールのクロマトグラム (MSD)。

低温のキラルカラムへ移したハートカット画分は、(リナロールのピークを含む) 8.5 ～ 8.9 分の部分を切り取ったものです。図5. (b) の FIDクロマトグラムで分かるとおり、ハートカットゾーンに対応する部分はベースラインがフラットになっています。このように、リナロールのピークが (2 番目のキラルカラムへは送られない溶出の遅い溶質を含む) 他のサンプル成分から切り離されています。

図 5. (c) は、キラルカラムでのリナロール分画物の同時分離を示したものです。このクロマトグラムから、低い温度においては 2 つの鏡像異性体が存在し、共溶出ピークのないことが分かります。この場合、(2 つの鏡像異性体を同量含む) ラセミ混合物がはっきりと現れているため、そのリナロールが合成由来であることが分かります。

ラベンダー油サンプルについても同様に多次元分析を行いました。1 番目のカラムにおけるバルクサンプルの分離を示すクロマトグラムと 2 番目のカラムにおけるハートカットのキラル分離を示すクロマトグラムを図 6. (a) ～ 6. (c) に示します。この場合、リナロールのピークが単一の光学異性体から構成されていることから、このリナロールは天然由来であると判断できます。

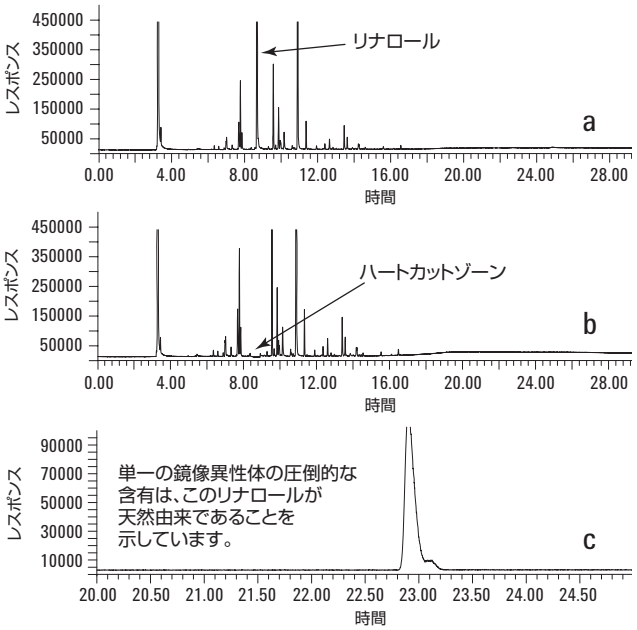

図 6. (a) ハートカットなしで 1 番目のカラム (Agilent J&W HP-5MS) で分離したラベンダー油サンプル。(b) 8.5 ～ 8.9 分のハートカットを 2 番目のカラムに移して分離したラベンダー油サンプルのクロマトグラム。(c) 2 番目のシクロデキストリンカラムで分離したリナロールのクロマトグラム (MSD)。単一の鏡像異性体が非常に多く含まれています 。

結論

このアプリケーションでは、二次元 GC 分離を目的としたカラムの個別温度制御の利点を明らかにしました。カラム温度の制御は、特にシクロデキストリンなどのキラル固定相にとっては非常に重要な問題です。2 番目の温度ゾーンに LTM カラムモジュールを使用することは、場所を取らずに Agilent 7890A GC システムへ独立した温度ゾーンを追加できるコスト効率の良い方法です。

低い温度と緩やかな昇温条件 (等温条件も有効) によってリナロールの光学異性体の分離能を改善する方法を紹介しました。GC で分析できる他のキラル化合物の分離についても同じような改善が期待できます。

1 番目の非選択的カラムから 2 番目のキラルカラムへの Deans スイッチハートカットを利用した多次元システムにより、市販の香水と天然ラベンダー油のサンプルを効果的に分析することができました。この方法によって得られる利点には、コストの削減、データ品質の向上 (リナロールピークの分離能の向上や干渉が懸念される物質からの切り離しの効率化)、繊細なキラルカラムに対する熱ストレスや化学的ストレスの低減などがあります。

参考文献

1. W.A. König, Gas Chromatographic Enantiomer Separation with Modified Cyclodextrins, Hüthig, Heidelberg, 1992, VIII + 168 pp., ISBN 3-7785-2026-1
2. C. Bicchi, A. D'Amato, P. Rubiolo, J. Chromatogr. A, 843 (1999) 99
3. V. Schurig, Trends in analytical chemistry, 21 (2002) 647
4. E.A. Pfannkoch, J.A. Whitecavage, V.R. Klinton, J. Christenson, Gerstel application note, May 2004 (www.gerstel.com/p-gc-an-2004-05.pdf)

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイトwww.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2009
Published in Japan
January 5, 2009
5990-3428JAJP

Agilent Technologies